

두경부 편평상피세포암과 절제연에서 Human Telomerase Reverse Transcriptase의 발현

경희대학교 의과대학 부속병원 이비인후과학교실, 원자력병원 이비인후과학교실*
김용범 · 송영호 · 노경섭 · 홍남표 · 안희영 · 이용식*

= Abstract =

Immunohistochemistry of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Resection Margin

Yong Bum Kim, M.D., Young Ho Song, M.D., Kyung Sup Rho, M.D.,
Nam Pyo Hong, M.D., Hwoe Young Ahn, M.D., Yong Sik Lee, M.D.*

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,* Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Background and Objectives : The expression of telomerase, a ribonucleoprotein complex, has been detected in tissues from many human cancers, but not in the majority of normal tissues except germ cell. It is believed that the activation of telomerase is linked to cellular immortality and may play a role in tumorigenesis. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) has been identified as a putative catalytic subunit of human telomerase and its expression is closely correlated with telomerase activity. We studied the expression of hTERT in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and resection margin by immunohistochemistry for hTERT and evaluate the correlation between hTERT expression and clinical data in HNSCC.

Materials and Methods : We performed a immunohistochemistry in 17 cases of HNSCC and 10 cases of resection margins, histologically normal. The correlations between the hTERT expression and the clinical data in HNSCC were analyzed.

Result : hTERT immunoreactivities were detected in 14 of 17 (82.4%) HNSCC, 1 of 10 (10%) resection margin. No correlation was observed between clinical data and hTERT expression in HNSCC.

Conclusion : hTERT is activated in HNSCC and its expression is independent from clinical data of patients.

KEY WORDS : Telomerase · Immunohistochemistry · hTERT · Squamous cell carcinoma.

서 론

인간의 염색체 말단에는 telomere라는 특수 구조가 있는데 이는 반복되는 DNA hexamer 즉 TTAGGG와 단백질로 되어 있으며 다른 염색체와의 비정상적인 결합을 방지하고 세포분열 때마다 염색체의 끝을 보호하는 중요한 기능을

가지고 있다¹⁾. 체세포가 분열할 때마다 telomere의 길이는 짧아지는데 어느 길이 이상 짧아지면 정상 체세포에서는 더 이상 세포 분열이 일어나지 않게 되어 세포의 수명을 제한한다²⁾.

Telomerase는 ribonucleoprotein으로 RNA dependant DNA polymerase로서 자신의 RNA를 형판으로 DNA를 복제하여 telomere의 길이를 유지시킨다³⁾. 출생 후의 체세포에서는 telomerase 활성도가 없어서 더 이상의 세포분열이 일어나지 않지만 사람의 생식세포, 불멸화세포주 (immortalized cell line), 그리고 대부분의 암세포에서는 telomerase 활성도가 계속 유지되어 telomere가 복원되고 세포분열이

교신저자 : 송영호 130-702 서울 동대문구 회기동 1
경희대학교 의과대학 부속병원 이비인후과학교실
전화 : (02) 958-8484 · 전송 : (02) 958-8470
E-mail : khuent@khmc.or.kr

연구 재료 및 방법

1. 연구 대상

2000년 4월부터 2000년 7월까지 경희의대 부속병원과 원자력 병원 이비인후과에서 두경부 영역의 편평상피세포암 증으로 수술을 받은 환자에서 17예의 암조직을 채취하였다. 17예 모두 각기 다른 환자에서 조직을 채취하였는데 그 중 원발병소가 8예이고 전이 림프절이 9예였다. 17예 중 남자는 13명이고 여자는 4명이었고 나이는 36세에서 86세까지였고 평균 연령은 55.8세이었다. 위의 환자 중 10예에서는 종양 절제연(resection margin)에서 조직검사 상 정상으로 판명된 조직을 채취하였다. 남자는 8명이고 여자는 2명이었고 나이는 36세에서 86세까지였으며 평균 연령은 57세이었다. 편평상피세포 암조직 17예는 성문상부암 6예, 설근암 3예, 하인두암 3예, 설암 2예, 구개편도암 1예, 상악동 암 1예, 원발미상의 암 1예였다.

각 환자에 대해 성별, 나이, 증상 시작 후 수술까지의 기간, 술 전 방사선 치료 여부, 술 전 항암제 치료 여부, 흡연 여부, 흡연량, 음주 유무, 종양의 병기 등을 조사하였다 (Table 1, 2).

대조군으로는 편도절제술을 시행한 환자에서 구강점막조직을 채취하여 4예를 음성 정상대조군으로 하였고, 위암 환자에서 위암조직을 채취하여 2예를 양성 대조군으로 하였다.

계속 일어 난다³⁻⁵). 이러한 사실은 telomerase의 활성이 암 세포의 불멸화와 연관이 있을 수 있다는 것을 암시한다⁴). Human telomerase reverse transcriptase(이하 hTERT)는 인간의 telomerase에서 catalytic subunit로 추정되는 부위이다. 이 hTERT의 발현은 *in vivo*와 *in vitro*에서 telomerase의 활성도와 밀접한 관계를 가진 것으로 알려져 있다^{6,7}).

hTERT의 발현양상을 알아보는 데는 주로 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(이하 RT-PCR)의 방법이 사용된다^{7,8}). 이러한 방법은 극소량의 조직으로 hTERT의 발현을 알 수 있고, 객관적인 정량을 할 수 있는 장점이 있으나 hTERT의 활성이 조직의 어느 부위에서 증가하는지, 세포 내 어느 부위에서 증가하는지를 알 수는 없다. 이에 반해 hTERT에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학검사를 시행하면 이와 같은 양상을 알 수가 있다^{8,9}). 그러나 지금까지 두경부 영역의 편평상피세포암종에 대해 이런 면역조직화학검사를 이용하여 hTERT의 발현을 조사한 연구가 아직 없었으며 또한 그 절제연에서의 발현율에 대해서도 조사된 바가 없었다.

이에 저자들은 hTERT에 대한 단순한 정량적인 분석이 아닌 형태학적 분석을 위한 초석으로서 anti-hTERT 항체를 이용한 면역조직화학검사를 시행하여 두경부영역의 종양 조직과 그 절제연에서 발현 양상을 알아보고, 또한 종양 조직에서의 hTERT의 발현과 종양의 병기, 성별, 흡연여부, 방사선 치료여부 등 여러 임상 인자들과의 연관성에 대해 알아보고자 한다.

Table 1. Characteristics in squamous cell carcinoma and immunoreactivity on hTERT

No	Diagnosis	Biopsy site		Sex	Age	Symptom onset (Mo)	preRT [†]	preCx [§]	Smoking Pack year	Alcohol	T	N	M	Immuno reactivity on hTERT	
		I* [*]	LN [†]												
1	Supraglottic ca	+		M	64	24	-	-	+	40	+	2	0	0	+
2	Supraglottic ca	+		M	68	12	-	-	+	40	+	2	0	0	-
3	Supraglottic ca	+		M	54	10	-	-	+	10	+				+
4	Tongue ca	+		F	61	2	-	-	-		-	2	0	0	+
5	Maxillary ca	+		F	61	4	-	+	-		-				+
6	Hypopharynx ca	+		M	61	2	-	-	+	50	+	2	2	0	+
7	Hypopharynx ca	+		F	36		+	-	-		-	3	0	0	+
8	Tongue base ca	+		M	45	6	+	+	+	15	+	3	1	0	+
9	Supraglottic ca		+	M	60	12	-	+	+	40	+	1	3	0	-
10	Supraglottic ca		+	M	62	142	-	+	+	18	+	2	3	1	+
11	Supraglottic ca		+	M	81	6	-	-	+	40	+	1	2	0	+
12	MUO		+	M	50	4	-	+	+	30	+				+
13	Hypopharynx ca		+	F	32	40	-	-	-		-	2	1	0	+
14	Tongue ca		+	M	43	27	+	-	+	20	-				-
15	Tonsil ca		+	M	57	3	-	+	+	18	+	2	2	0	+
16	Tongue base ca		+	M	55		-	+	+	30	+	3	1	0	+
17	Tongue base ca		+	M	58	8	-	+	+	30	-	2	2	0	+

I*^{*}: primary lesion, LN[†]: lymph node, preRT[†]: preoperative radiation therapy, preCx[§]: preoperative chemotherapy, MUO^{||}: metastasis from unknown origin

Table 2. Characteristics in resection margin specimen and immunoreactivity on hTERT

No	Diagnosis	Biopsy site		Sex	Age	Symptom onset (Mo)	preRT [†]	preCx [§]	Smoking Pack year	Alcohol	T	N	M	Immuno reactivity on hTERT	
		1* [*]	LN [†]												
1	Supraglottic ca	+		M	64	24	-	-	+	40	+	2	0	0	-
2	Supraglottic ca	+		M	54	10	-	-	+	10	+				-
3	Tongue ca	+		F	61	2	-	-	-		-	2	0	0	+
4	Hypopharynx ca	+		M	61	2	-	-	+	50	+	2	2	0	-
5	Hypopharynx ca	+		F	36		+	-	-		-	3	0	0	-
6	Tongue base ca	+		M	45	6	+	+	+	15	+	3	1	0	-
7	Tongue ca		+	M	43	27	+	-	+	20	-				-
8	Supraglottic ca		+	M	81	6	-	-	+	40	+	1	2	0	-
9	MUO [‡]		+	M	68	5	+	+	+	30	+				-
10	Tongue base ca		+	M	58	8	-	+	+	30	-	2	2	0	-

1*^{*}: primary lesion, LN[†]: lymph node, preRT[†]: preoperative radiation therapy, preCx[§]: preoperative chemotherapy, MUO[‡]: metastasis from unknown origin

2. 연구 방법

1) 면역조직화학검사

각각의 조직을 -70°C 로 보관하였다. 신선한 검체를 포매액(embedding medium)에 넣은 상태에서 냉동 절편을 하여 $10\mu\text{m}$ 두께의 절편을 만들었다. 30분간 상온에서 말린 후 phosphate buffered saline(이하 PBS)로 세척하고 포르말린 용액에서 15분간 처리하였다. 그 후 다시 PBS로 세척한 후 상온에서 30분간 말렸다. 조직절편은 먼저 조직 내에 존재하는 내재성 페록시다제(endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1% H_2O_2 에서 15분간 반응시킨 후 10분씩 3회 PBS로 세척하였다.

일차항체로는 rabbit polyclonal anti-hTERT antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 0.05% bovine serum albumin, 1.5% goat serum 및 0.3% Triton X-100이 들어 있는 용액으로 1:200으로 희석한 후 조직과 90분 동안 4°C 에서 진탕하면서 반응시켰다. 1차 항체용액과의 반응이 끝나면 조직을 PBS로 10분씩 3번 세척한 후 EnVision system의 biotinylated anti-IgG(DAKO, Copenhagen, Denmark)를 0.3% Triton X-100이 들어 있는 용액으로 1:200으로 희석한 2차 항체용액과 60분 동안 실온에서 반응시키고 이후 PBS로 3차례 세척하였다.

이후 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma, St. Louis, Mo.)를 0.05M Tris 완충액으로 0.02%로 희석하고 H_2O_2 를 0.003%로 첨가한 용액과 상온에서 5분간 반응시켜 발색시켰다. 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 발색이 끝난 조직은 0.1% hematoxylin으로 주위조직에 대해 대조염색을 한 후 gelatin-coated slide에 없어서 실내에서 건조시켰다. 발색이 끝난 후 xylene으로 투명화시키고 polymount로 봉입하였다.

2) 평가

광학현미경으로 200배, 400배로 관찰하여 핵이 갈색으로

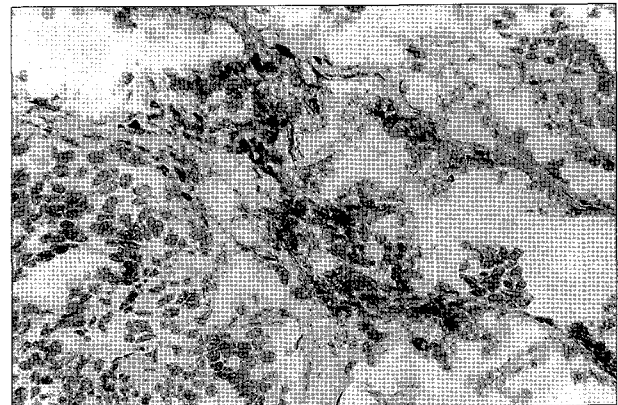


Fig. 1. Immunohistochemical detection of hTERT protein in head and neck squamous cell carcinoma. It show that many nuclei of SCC are stained brown ($\times 200$).

염색된 부위를 양성 반응으로 간주하였다. 세포질에 염색된 것은 비특이적인 반응이므로 양성으로 인정하지 않았다⁸⁾⁹⁾.

3. 통계적 처리

통계학적 분석은 SPSS(version 7.5)를 사용하였는데, 원발부위와 전이부위에 따른 hTERT의 발현율의 차이는 chi-square test를 이용하였다. hTERT의 발현양상과 임상인자와의 연관성을 알아보기 위한 통계방법으로는 우선 성별, 술 전 방사선 치료 유무, 술 전 항암제 치료 유무, 음주, 흡연의 유무에 따른 hTERT의 발현율의 차이는 chi-square test를 이용하였고 나이, 증상 지속기간, 흡연량, 종양의 병기와 hTERT 발현율과의 상관여부는 independent-samples T-test를 이용하였다. p값이 0.05이하인 경우를 통계학적으로 유의하다고 하였다.

결 과

17예의 종양조직 중 14예(82.4%)에서 면역조직화학검사상 양성반응이 나왔다. 원발병소에서 채취한 군은 8예 중 7예(87.5%)에서, 전이 림프절 조직에서는 9예 중 7예(77.

8%)에서 양성 반응을 나타내었다(Table 1, Fig. 1, 2, 3). 10예의 절제연 조직에서는 1예(10.0%)에서 면역조직화학 검사 양성이 나왔다(Table 2).

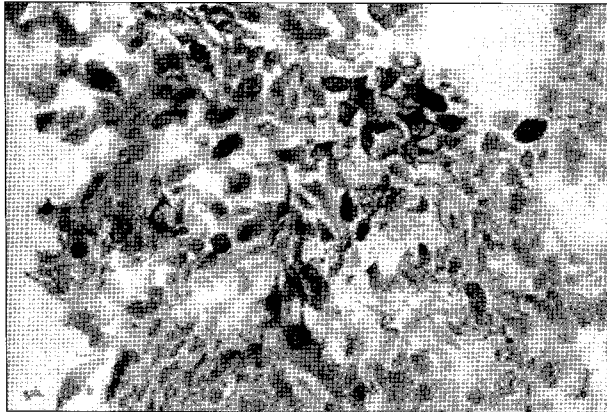


Fig. 2. The hTERT protein stained brown in nuclei in head and neck squamous cell carcinoma ($\times 400$).

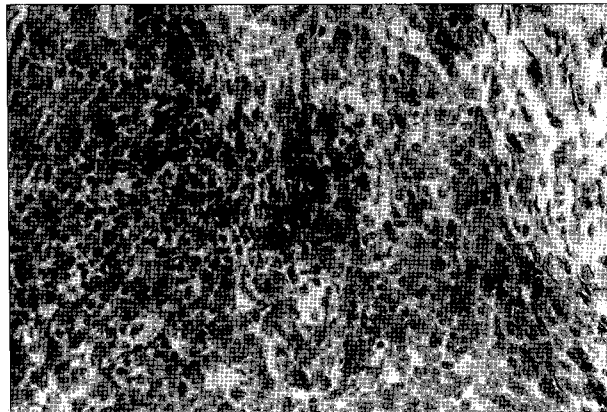


Fig. 3. Negative finding in Immunohistochemistry for hTERT protein in head and neck squamous cell carcinoma without brown colored nuclei ($\times 200$). Cytoplasmic staining is non-specific.

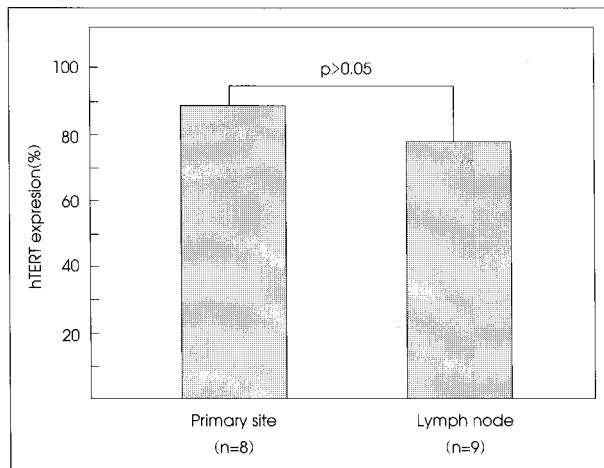


Fig. 4. The immunohistochemical expressions of hTERT in primary cancer site and metastatic lymph node. Expression rate is 87.5% in specimens from primary cancer site, 77.8% in specimens from metastatic lymph node. There is no statistically significant difference of expression between these groups ($p > 0.05$).

원발부위와 전이 림프절 조직간의 hTERT의 발현율은 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$) (Fig. 4). 종양조직에서의 hTERT의 발현율은 성별, 나이, 증상 시작 후 수술까지의 기간, 술 전 방사선 치료 여부, 술 전 항암제 치료 여부, 흡연 여부, 흡연량, 음주 유무, 종양병기와 유의한 상관관계를 보이지 않았다($p > 0.05$).

고 찰

암의 발생과정 중 암세포가 불멸화를 획득하는 것이 중요한 과정이라고 알려져 있다⁴⁾. 그중 가장 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 효소가 telomerase인데 생식세포와 불멸화 종양세포에서 증가된다³⁻⁵⁾. 이러한 telomerase의 발현율을 아는 데는 TRAP을 이용한 방법이 가장 많이 이용되고 있다. 기존의 연구에서 두경부암의 대부분을 차지하는 편평상피 세포암에 대해 TRAP을 이용한 telomerase의 발현율을 조사한 결과 80~100%의 양성율을 나타내었다¹⁰⁻¹³⁾. Curan 등¹⁰⁾에 의하면 구강 편평상피세포암종 20예 중 18예(90%)에서, Hoas 등¹¹⁾에 의하면 후두 편평상피세포암종 35예 중 32예(89%)에서, Mutirangura 등¹²⁾에 의하면 두경부 편평상피세포암종 16예 중 14예(87.5%)에서, Mao 등¹³⁾에 의하면 두경부 편평상피세포암종 16예 중 모두에서 telomerase의 발현을 나타내었다.

인간의 telomerase에는 크게 세 가지 주요 구조가 있는 것으로 알려졌다. human telomerase RNA(이하 hTR), telomerase associated protein(이하 TP1) 그리고 human telomerase reverse transcriptase(이하 hTERT) 등인데 정상 세포 및 암세포에서 위 세 가지 성분의 발현에 대해 연구가 있어 왔다¹⁴⁾. hTR과 TP1의 mRNA 발현은 정상세포와 암세포에서 공통적으로 보였으나, 인간의 telomerase에서 catalytic subunit로 추정되는 hTERT의 mRNA 발현은 telomerase 양성 발현을 보이는 암조직에서 주로 발현되었다⁷⁾¹⁵⁾.

최근 면역조직화학검사를 시행하여 hTERT의 발현을 알아내는 연구가 있어왔다. hTERT의 가운데 부분의 아미노산 서열 일부를 토끼에 주사하여 얻어낸 anti-hTERT 항체를 이용한 면역조직 화학검사를 위암조직과 대장 항문암 조직에서 시행한 결과 갈색의 염색이 암세포의 핵에 강하게 나타나는 양상이 각각 100%, 83.3%에서 나타난 보고가 있었다⁸⁾⁹⁾. 세포질에 나타나는 갈색의 염색은 항원 펩티드를 이용한 pre-absorbing에 의해 감소되지 않으나 핵에 나타나는 면역염색은 감소되는 양상을 보인다. 따라서 세포질에 나타나는 갈색의 염색은 비특이적인 반응으로 생각되며 단독 시 양성으로 인정하지 않았다⁸⁾. 저자들이 anti-hTERT 항체를 이용한 면역조직화학검사를 실험한 결과 82.4%에

서 양성반응이 나왔다. 이 결과로 두경부 편평상피세포암에서 hTERT가 활성화됨을 알 수 있었고 또한 anti-hTERT antibody를 이용한 면역염색에서의 hTERT의 발현율은 기존의 TRAP을 이용한 telomerase의 발현율과 비슷하다. 이는 hTERT와 밀접한 관계가 있는 telomerase의 발현이 종양의 발생에 역할을 한다는 기존의 연구와 일치한다⁴⁾.

기존의 연구에서 telomerase의 발현과 임상양상을 비교한 결과를 보면 일부 연관성이 있는 것으로 나타났다. Curan 등¹⁰⁾의 연구에 의하면 구강 편평상피세포암중에서 telomerase의 발현율을 임상 양상과 비교하여 보면 T1과 T2에서의 발현율은 T4에서의 발현율과 의미있는 차이를 나타내었고 Hoas 등¹¹⁾에 의하면 후두 편평세포암중에서의 telomerase의 발현은 종양의 병기와 유의한 연관이 있다고 하였으나 조직학적 병기, 나이, 흡주 또는 흡연 여부와는 연관이 없다고 하였다. 본 연구에서는 두경부편평세포암중의 hTERT 발현과 임상양상과의 연관성에 대하여 알아보았으나 통계학적 의의는 없는 것으로 나타났다.

Brennan 등¹⁶⁾은 두경부 편평상피세포암중의 절제연에서 p53 변이의 분석을 하여 국소재발에 대한 예측도를 높일 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 동일한 목적으로 절제연에서의 hTERT 양성, 음성 반응에 따른 추후 재발 여부에 관하여 연구하고자 하였다. p53변이는 두경부암에서 40~60%의 양성율을 나타내나 저자들의 결과에서는 hTERT가 82.4%의 상대적으로 높은 양성율을 보여 더 유용한 지표가 될 수 있으리라 사려된다¹⁷⁻¹⁹⁾. 본 실험에서 10례의 절제연 조직 중 1례에서 양성반응이 나왔는데 관찰 기간이 짧아 환자들에 대한 추적관찰에서 재발 여부를 확인 할 수 없었다. 추후 좀더 많은 개체 수에 대하여 검사를 하고 장기적인 추적관찰이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

두경부 영역의 편평상피세포암중에서 hTERT가 발현됨을 면역조직화학검사를 통해 알 수가 있었고, 이 hTERT의 발현은 두경부 편평세포암 환자의 임상양상과 연관성이 없었다.

중심 단어 : Telomerase · 면역조직화학염색 · 편평세포암.

References

- 1) Blackburn DH : Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991 ; 350 : 569-573
- 2) Harley CB : Telomere loss : Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Res*. 1991 ; 256 : 271-282
- 3) Blackburn EH : Telomerase. *Annu Rev Biochem*. 1992 ; 61 :

- 113-129
- 4) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 ; 226 : 2011-2015
- 5) Shay JW, Bacchetti S : A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J cancer*. 1997 ; 33 : 787-791
- 6) Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al : Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*. 1997 ; 277 : 955-959
- 7) Meyerson MC, Counter CM, Eaton EN, et al : hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997 ; 90 : 785-795
- 8) Yasui W, Tahara E, Thara H, et al : Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn J Cancer Res*. 1999 ; 909 : 589-595
- 9) Tahara H, Yasui W, Thara E, et al : Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*. 1999 ; 18 : 1561-1567
- 10) Curran AJ, Denis KS, Irish J, Gullane PJ, MacMillan C, Kamel-Reid S : Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 ; 124 : 784-788
- 11) Hoas S, Cavallo S, Bellascosa A, et al : Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 1996 ; 2 : 1895-1900
- 12) Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S, et al : Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996 ; 56 : 3530-3533
- 13) Mao Li, EL-Naggar AK, Fan YH, et al : Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissue. *Cancer Res*. 1996 ; 56 : 5600-5604
- 14) Harrington L, McPhail T, Mar V, et al : A mammalian telomerase-associated protein. *Science*. 1997 ; 275 : 973-977
- 15) Toshihuni N, Nouse K, Higashi T, et al : Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2000 ; 82 : 833-837
- 16) Brennan JS, Mao L, Hruban R : Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of head and neck. *N Engl J Med*. 1995 ; 332 : 429-435
- 17) Jung KY, Choi JO : Clinical significance of the expression of oncosuppressor gene proteins and epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the larynx. *Korean J Otolaryngol*. 1993 ; 36 : 990-1004
- 18) Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Sato S, Nikai H : Expression of p53 and p21CIP1/WAF1 proteins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinomas. *Oncol Rep*. 1999 ; 6 : 539-545
- 19) Francchiolla NS, Capaccio P, Carboni N, et al : Immunohistochemical and molecular analysis of bax, bcl-2 and p53 genes in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*. 1999 ; 19 : 1043-1051